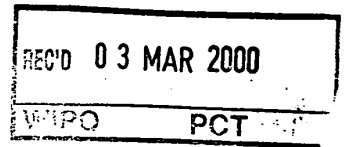


## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 00 / 00079



## Bescheinigung

ESU

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Selektion von monoklonalen Antikörpern"

am 11. Januar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. Februar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 00 635.0

Wassnig

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Unser Zeichen: 2527 - hu / msl

### **Selektion von monoklonalen Antikörpern**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern sowie hierfür verwendbare Mittel.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beruht auf einem von Köhler und Milstein entwickelten Verfahren. Nach diesem Verfahren werden B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert, wodurch Antikörper-produzierende Hybridomzellen erhalten werden. Ein solches Verfahren weist große Nachteile auf. Insbesondere ist es aufwendig Antikörper zu selektionieren, da dies eine getrennte Kultivierung von Hybridomzellen erfordert. Letzteres führt auch dazu, daß nur eine begrenzte Zahl von Hybridomzellen erfaßt und somit auch nicht alle Antikörper selektioniert werden können, was insbesondere nachteilig ist, wenn Antikörper mit höchster Affinität für ein Antigen selektioniert werden sollen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem monoklonale Antikörper hergestellt werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß monoklonale Antikörper auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden können. Er hat erkannt, daß hiermit monoklonale Antikörper selektioniert werden können, ohne daß Hybridomzellen getrennt kultiviert werden müssen. Auch hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern sowohl gegenüber einem bestimmten als auch vielen (un)bestimmten Antigenen einer Antigen-Bibliothek erfolgen kann. Ferner hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern auch hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen erfolgen kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern bereitzustellen. Ein solches Verfahren umfaßt die Fusionierung von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.

Der Ausdruck "B-Lymphozyten" umfaßt B-Lymphozyten jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorstufen von B-Lymphozyten sein. Ferner können die B-Lymphozyten von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Desweiteren können die B-Lymphozyten von einem gesunden oder kranken Organismus stammen. Günstig ist es, wenn sie von einem immunisiertem Organismus stammen. Besonders günstig ist es, wenn die B-Lymphozyten für humane Antikörper oder Teile davon kodieren. Handelt es sich um B-Lymphozyten aus Tieren, ist dies erreichbar, indem die Tiere für die humanen Antikörper bzw. Teile davon transgen sind. Die Herstellung solcher Tiere kann durch übliche Verfahren erfolgen, wobei sich anbietet, die Gene für die humanen Antikörper die Teile davon in embryonale Stammzellen einzuführen, aus denen dann die Tiere generiert werden. Die Bereitstellung von B-Lymphozyten und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Myelomzellen" umfaßt Myelomzellen jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorläufer von Myelomzellen sein. Ferner können die Myelomzellen von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Bevorzugte Myelomzellen sind Abkömmlinge der Maus-Stämme P3K, P3-X63.Ag8, X63.Ag8.653, NSO/1, Sp2/O-Ag14 und FO, der Ratten-Stämme Y3-Ag1.2.3, YB2/O und IR9834, und der menschlichen Stämme U266, SK007 und Karpas 707. Die Bereitstellung von Myelomzellen und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Antikörper-produzierende Hybridomzellen" umfaßt Zellen, die durch Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstehen und Antikörper

produzieren. Es wird auf die Ausführungen hinsichtlich B-Lymphozyten und Myelomzellen entsprechend verwiesen. Hybridomzellen können tierische und/oder menschliche Nukleinsäuren bzw. Proteine aufweisen. Die Kultivierung von Hybridomzellen kann durch übliche Verfahren erfolgen. Ferner kann es günstig sein, wenn die Hybridomzellen Rekombinasen, z.B. Rag1 oder Rag2, und/oder Mutasen (über)exprimieren. Solches kann durch Transfektion der Hybridomzellen mit entsprechenden Expressionsvektoren erreicht werden. Der Fachmann kennt solche Expressionsvektoren.

Der Ausdruck "Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen" betrifft jegliches Verfahren, mit dem diese Zellen fusioniert werden können. Günstig ist ein Verfahren, bei dem die Zellen über Polyethylenglykol fusioniert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Bindung der Antikörper an Antigene" betrifft jegliches Verfahren, mit dem die auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen exprimierten Antikörper an Antigene binden können. Die Antigene können an Trägern, z.B. Magneto-beads, gebunden sein. Ferner können sie markiert, z.B. fluoreszenzmarkiert, sein. Als Fluoreszenzmarker bieten sich z.B. FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin an. Desweiteren können die Antigene an Biotin gekoppelt sein. Gebundene Antigene können dann durch übliche Verfahren, z.B. FACS-Analyse, nachgewiesen werden, wodurch auch die entsprechenden Antikörper detektiert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Antikörper-Bindeprotein" umfaßt jegliches Protein, das einen Antikörper binden und an der Zelloberfläche von Hybridomzellen präsentieren kann. Insbesondere kann das Protein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker aufweisen. Beispiele für ein solches Protein sind natürliche Fc-Bindeproteine, wie CD16, CD32 und CD64. Ferner kann das Protein eine Kombination aus einem Signalpeptid, einer Antikörper-Bindestelle und einem Membrananker aufweisen, die in der Natur nicht vorkommt. Eine solche Kombination kann Teile natürlicher

Fc-Bindeproteine umfassen. Ferner kann sie als Signalpeptid ein solches einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, als Membrananker eine Transmembran-Domäne von PDGRF oder CD52 und als Antikörper-Bindestelle eine Antigen-Bindungsdomäne eines bakteriellen Proteins, wie Protein A, Protein G, Protein L oder Protein LG, aufweisen. Günstig kann es sein, wenn die Kombination mehrere Signalpeptide, Antikörper-Bindestellen und/oder Membrananker aufweist. Besonders günstig kann es sein, wenn das Antikörper-Bindeprotein, insbesondere die Antikörper-Bindungsdomäne der bakteriellen Proteine Codons aufweist, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind. Der Fachmann weiß, um welche Codons es sich hier handelt.

Bevorzugte Antikörper-Bindeproteine sind in den Figuren 1-3 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 umfaßt das Signalpeptid eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, vier Antikörper-Bindungsdomänen des Proteins L und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 2 umfaßt das Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 647-1420 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 3 umfaßt das Signalpeptid des Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von PDGFR. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1431 angegeben. Die Antikörper-Bindestellen aller drei Antikörper-Bindeproteine weisen auf DNA-Ebene Codons auf, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind.

Ein Antikörper-Bindeprotein der Figuren 1, 2 bzw. 3 kann eine Aminosäuresequenz aufweisen, die sich durch ein oder mehrere Aminosäuren von der Aminosäuresequenz in den Figuren 1, 2 bzw. 3 unterscheidet. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von

einzelnen Aminosäuren liegen. Allerdings hybridisiert die DNA dieses Antikörper-Bindeproteins mit der in den Figuren 1, 2 bzw. 3 angegebenen DNA. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, hin. Ferner weist das Antikörper-Bindeprotein mit der veränderten Aminosäuresequenz Gesamt- bzw. Teilfunktionen auf, die mit jenen des Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3 vergleichbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Antikörper-Bindeprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine sich durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA" umfaßt jegliche für ein Antikörper-Bindeprotein der Figuren 1, 2 bzw. 3 kodierende DNA, die mit der DNA der Fig. 1, 2 bzw. 3 hybridisiert. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Basenpaaren liegen. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein Antikörper-Bindeprotein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, pCDM8 und pCEV4

anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Bacculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Bevorzugte Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA enthalten, sind in den Figuren 1-3 angegeben. Es handelt sich um die Expressionsvektoren pSEX11L4, pSEX11G2<sup>\*</sup> und pSEX15G2. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) am 14. Dezember 1998 hinterlegt. Im einzelnen wurde pSEX11L4 unter DSM 12580, pSEX11G2<sup>\*</sup> unter DSM 12581 und pSEX15G2 unter DSM 12582 hinterlegt.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme XL-1 Blue, Top 10 F, HB101, DH5alpha, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, die Hefe-Stämme *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Myelom- und Hybridomzellen sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere

Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- (b) eine eine erfindungsgemäße DNA exprimierende Zelle,
- (c) ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein,
- (d) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (e) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, Marker, Nachweisreagentien für die Komponenten (a) - (d)

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß von Hybridomzellen produzierte Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen präsentiert werden. Dies erfolgt über ein Antikörper-Bindeprotein. Ein solches kann über die zur Herstellung der Hybridomzellen verwendeten Myelomzellen in die Hybridomzellen eingeführt werden. Ferner kann das Antikörper-Bindeprotein über einen es kodierenden Expressionsvektor in die Hybridomzellen eingeführt werden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Antikörper zu selektionieren. Dies kann ohne großen Aufwand erfolgen, da Hybridomzellen nicht getrennt kultiviert werden müssen. Vielmehr können komplexe Gemische von Hybridomzellen unmittelbar zur Selektion von Antikörpern verwendet werden. Ferner können

Antikörper hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen selektiert werden. Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung Antikörper von Hybridomzell-Bibliotheken nicht nur gegenüber einem bestimmten Antigen, sondern auch gegenüber vielen (un)bestimmten Antigenen von Antigen-Bibliotheken zu selektionieren.

Somit liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel, mit dem u.a. die großen Zeit- und Kosten-Probleme vermieden werden können, die bei der Selektion von monoklonalen Antikörpern bisher auftraten.



#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11L4 (Fig. 1(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 1(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 2 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11G2\* (Fig. 2(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 2(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.




Fig. 3 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX15G2 (Fig. 3(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 3(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung von Myelomzellen, die ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.**

**(A) Transiente Expression**

Es werden Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Zellen ( $10^7$ ) werden mit 20-40  $\mu\text{g}$  des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2\* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 500 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in RPMI-Medium, das 10 % FCS enthält, bei 37°C und 5-7,5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0.1 % Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0.1 % Na-Azid plus 25  $\mu\text{g/ml}$  Ziege anti-Kalb Antikörper (FITC markiert; GAB-FITC, Dianova) inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0.1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0.1 % Na-Azid + 1  $\mu\text{g/ml}$  Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Myelomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen, die durch die transiente Expression eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche der Myelomzellen bedingt ist.

**(B) Stabile Expression**

Die unter (A) erhaltenen Myelomzellen werden einer 14-24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie, wie unter (A) beschrieben, mit GAB-FITC inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Myelomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 erhalten, die stabil ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

**Beispiel 2: Herstellung von Hybridomzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Antikörper mittels eines Antikörper-Bindeproteins exprimieren.**

**(A)**

Es werden 10 Balb/c-Mäuse subkutan mit je 100  $\mu\text{g}$  abgetöteten *Helicobacter pylori* Bakterien in komplettem Freund'schen Adjuvans, das abgetötete *Mycobacter tuberculosis* Bakterien enthält, immunisiert. Nach 4 bzw. 7 Wochen erfolgt jeweils eine intraperitoneale Booster-Injektion mit 100  $\mu\text{g}$  abgetöteter *Helicobacter pylori* / *Mycobacter tuberculosis*-Bakterien. Den Mäusen werden vor jeder Immunisierung bzw. nach der letzten Immunisierung jeweils 100  $\mu\text{l}$  Blutserum entnommen und im Westernblot wird die Antigen-spezifische Immunantwort der Maus überprüft. Als Antigen wird ein Aufschluß von bakteriellem Gesamtprotein von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis* verwendet. Der Nachweis gebundener Maus-Antikörper wird durch einen Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörper (Dianova) geführt. Mäusen mit einer deutlichen Antigen-spezifischen Immunantwort wird die Milz entnommen und die Lymphozyten werden mit Zellen der Myelomzelle X63-Ag8.653.3 von Beispiel 1 (B) fusioniert. Die Fusion erfolgt durch Polyethylenglykol (vgl. Goding, J.W., Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3. Auflage, (1996), Verlag Accademic Press Limited, 24-28). Es werden Hybridomzellen erhalten. Diese werden 10-12 Tage in HAT-Medium bei 37°C inkubiert. Es wird die Hybridomzell-Bibliothek 2A erhalten.

Es werden Hexapeptide mit N-terminalem Biotin synthetisiert. Die Peptide entsprechen den 6C-terminalen Aminosäuren von 101 bzw. 118 Genprodukten von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis*. Ferner werden  $10^3$  Zellen der Hybridomzell-Bibliothek 2A mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  der vorstehenden Biotin-markierten Peptide inkubiert. Die Zellen werden mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Steptavidin-FITC inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1 % Na-Azid + 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Helicobacter pylori- bzw. Mycobacter tuberculosis-Aktivität aufweisen.

(B)

Es werden Zellen der Hybridomzelllinie U98/6, die einen Maus-anti-Urokinase-Antikörper produzieren, verwendet. Diese Zellen ( $10^7$ ) werden mit 20-40 µg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2\* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 400 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in inkomplettem AIM V-Medium bei 37°C und 5-7,5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0.1 % Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0.1 % Na-Azid + 10 µg/ml Urokinase-Biotin inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0.1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0.1 % Na-Azid + 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Urokinase-Aktivität aufweisen.

Die erhaltenen Hybridomzellen werden einer 14-24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie erneut, wie vorstehend beschrieben mit Urokinase-Biotin und Streptavidin-FICS inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Hybridomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Hybridomzelllinie U98/6.3.3 erhalten, die stabil Antikörper auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

**Beispiel 3: Selektion von monoklonalen Antikörpern, die mittels eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen exprimiert werden.**

$10^3$  Zellen der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) werden mit  $10^7$  Zellen der Hybridomzelllinie DOB.L1.3 gemischt. Letztere Hybridomzelllinie produziert einen den C-Terminus der humanen HLA-DO- $\beta$ -Kette erkennenden Antikörper. Dieser wird mittels des gleichen Antikörper-Bindeproteins wie in der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Zellgemisch wird mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10  $\mu$ g/ml Urokinase-Biotin inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1 % Na-Azid wird das Zellgemisch in DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10  $\mu$ g/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht in einen FACS-Sorter gegeben.

Es werden Hybridomzellen mit grüner Fluoreszenz selektioniert. In weiterführenden Untersuchungen zeigen diese eine anti-Urokinase-Aktivität. Es werden die Hybridomzelllinien U98/6.3.3 S1-S50 erhalten.

**Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeproteins**

**(A)**

Die DNA von Fig. 1 zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/Antikörper-Bindeprotein erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/Antikörper-Bindeprotein wird zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin und 25 $\mu$ g/ml Kanamycin

kultiviert und 4 h mit 60  $\mu$ M Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qia-gen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

**(B)**

10<sup>8</sup> Zellen der in Beispiel 1 (B) erhaltenen Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 werden mit PBS gewaschen, in PBS + 1 % Tween 20 aufgenommen und auf Eis inkubiert. Partikuläre Zellbestandteile werden durch Zentrifugation bei 30.000g abgetrennt und der Überstand wird auf eine IgG Sepharose Säule (IgG Sepharose 6 Fast Flow Lab Pack von Pharmacia) gegeben. Ungebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt und das erfindungsgemäße Antikörper-Bindeprotein wird in saurem pH eluiert.

Nach seiner Neutralisierung wird das Antikörper-Bindeprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. vorstehend).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

**Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18 % SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 41 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

#### Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35  $\mu$ g gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- |         |   |
|---------|---|
| Tag 0:  | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)         |
| Tag 14: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 28: | 3. Immunisierung (icFA)                                 |
| Tag 56: | 4. Immunisierung (icFA)                                 |
| Tag 80: | Ausbluten   |

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 $\mu$ M 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 $\mu$ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100

mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

#### **Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn**

Pro Immunisierung werden 40 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0.        1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28:      2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 50:      3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

#### **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

Pro Immunisierung werden 12 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- Tag 0.        1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28:      2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 56:      3. Immunisierung (icFA)
- Tag 84:      4. Immunisierung (PBS)
- Tag 87:      Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Unser Zeichen: K 2527 - hu / wd

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.  
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker umfaßt.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Fc-Bindeprotein oder Teile davon umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus Fc-Bindeproteinen oder Teilen davon umfaßt.  
15
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Fc-Bindeprotein CD16, CD32 oder CD64 ist.
- 20 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 5, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Antikörper-Bindungsdomäne der Proteine A, G, L oder LG umfaßt.
- 25 7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

- 2 -

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Antikörper-Bindeprotein jenes von Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die Hybridomzellen Rag1 und/oder Rag2 (über)exprimieren.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, wobei die Antigene von einer Antigen-Bibliothek stammen.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Träger Magnetobeads umfaßt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene eine Fluoreszenz- oder Biotinmarkierung umfassen.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Fluoreszenzmarkierung FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin umfaßt.
15. Antikörper-Bindeprotein, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.
16. Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15, wobei das Antikörper-Bindeprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2 bzw. Fig. 3 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
17. DNA, kodierend für das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 16, um-

fassend:

(a) die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder

5

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten Code verwandte DNA.

18. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 17.

10

19. Zellen, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 18.

20. Antikörper, gerichtet gegen das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15 oder 16.

15

Unser Zeichen: K 2527 - hu / msl

## **Zusammenfassung**

### **Selektion von monoklonalen Antikörpern**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene. Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Mittel.

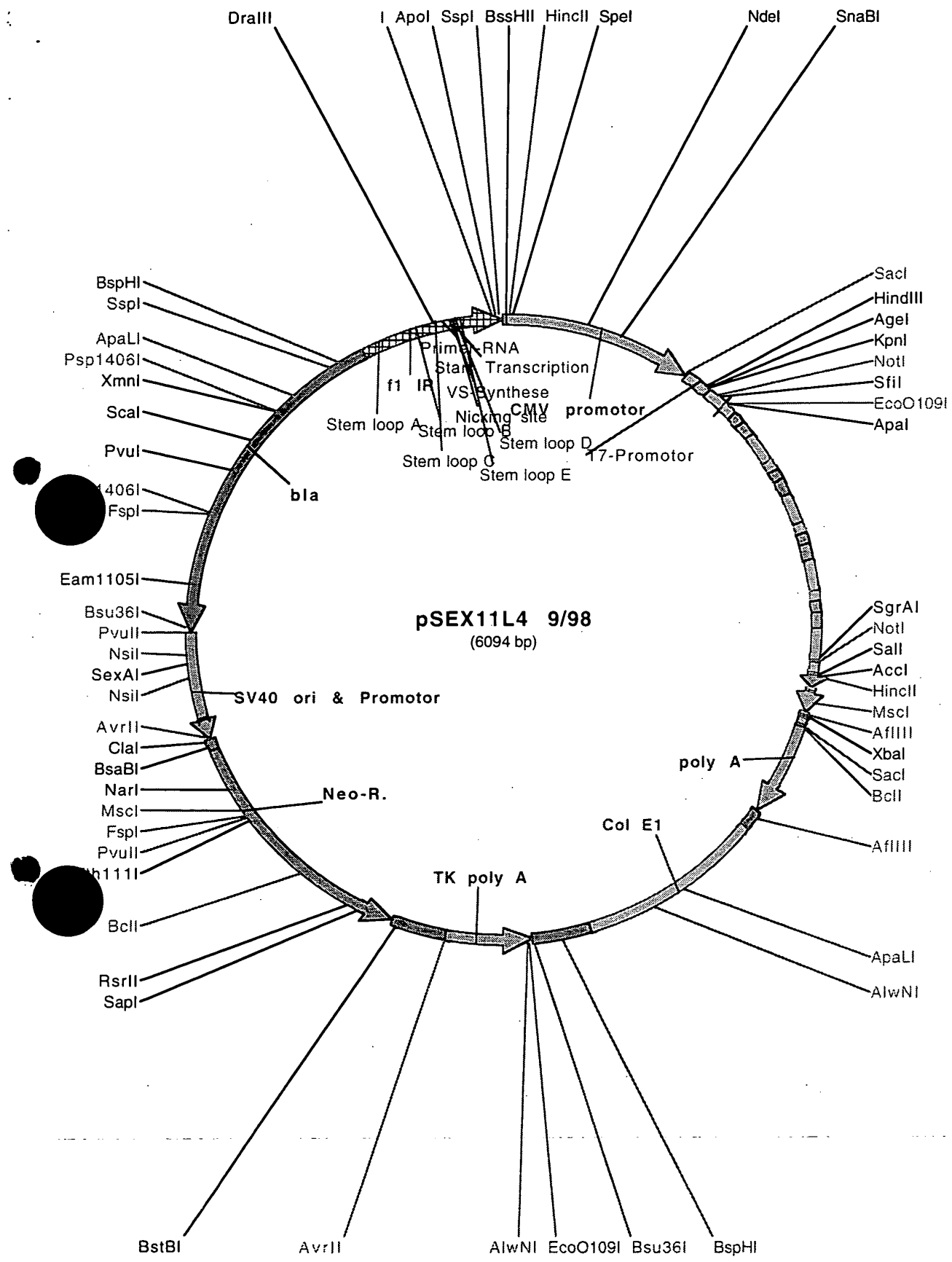


Fig. 1 (A)

BssHII HincII SpeI  
 1 GCGCGCGTTGACATTTTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA  
 76 TGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT  
 151 CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGT  
 226 AACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT  
 301 GGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA  
 376 TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTTC  
 451 CAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCTGTA  
 526 ACAACTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGC  
 T7-Promotor  
 1 TAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACC  
 SfiI NotI SgrAI NotI  
 676 GGTGCGATGGCACCCCTGCATGCTGCTCCTGCTGTTGGCGCGCCCTGGCCCCGACTCAGACCCGCGCGGGGGCC  
 1 MetAlaProCysMetLeuLeuLeuLeuLeuAlaAlaLeuAlaProThrGlnThrArgAlaGlyAla  
 751 CAAAAGGAGAAGACCCCGAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAG  
 24 GlnLysGluLysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLys  
 826 ACCCAGACCGCCGAGTTCAAGGGCACCTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCCTACCGCTACGCCGACGCCCTGAAG  
 49 ThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLys  
 901 AAGGACAACGCGGAGTACACCGTGGACGTGGCCGACAAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTCCCGCGCAAGGAG  
 74 LysAspAsnGlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGlu  
 976 AAGACCCCGAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAGACCCAGACC  
 99 LysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThr  
 1051 GCCGAGTTCAAGGGCACCTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCCTACCGCTACGCCGACGCCCTGAAGAAGGACAAC  
 124 AlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsn  
 1126 GGCGAGTACACCGTGGACGTGGCCGACAAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTCCCGCGCAAGGAGAAGACCCCG  
 149 GlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrPro  
 1301 GAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAGACCCAGACCGCCGAGTTTC  
 144 GluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPhe  
 176 AAGGGCACCTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCCTACCGCTACGCCGACGCCCTGAAGAAGGACAACGCGGAGTAC  
 199 LysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyr  
 1351 ACCGTGGACGTGGCCGACAAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTCCCGCGCAAGGAGAAGACCCCGAGGAGGCC  
 224 ThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrProGluGluPro  
 1426 AAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAGACCCAGACCGCCGAGTTCAAGGGCACC  
 249 LysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThr  
 1501 TTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCCTACCGCTACGCCGACGCCCTGAAGAAGGACAACGCGGAGTACACCGTGGAC  
 274 PheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyrThrValAsp  
 SgrAI NotI  
 1576 GTGGCCGACAAGGGCTACACCCCTGAACATCAAGTTCCCGCGCGCGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAAGG  
 299 ValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyAlaAlaAlaGluGlnLysLeuIleSerGluGlu  
 Sall HincII AccI  
 1651 GATCTGAATGGGCGGTGACGGACAAAACGACACCAGCCAAACCAGCAGCCCTCAGCATCCAGCAACATAAGC  
 324 AspLeuAsnGlyAlaValAspGlyGlnAsnAspThrSerGlnThrSerSerProSerAlaSerSerAsnIleSer

Fig. 1 (B)

1726 GGAGGCATTTTCCTTTTCTTGGCCAATGCCATAATCCACCTCTTCTGCTTTGAGGTGACACGCTAGAA  
 349 GlyGlyIlePheLeuPhePheValAlaAsnAlaIleIleHisLeuPheCysPheSer...

1801 GCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT  
 SacI BclI

1876 GTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAG  
 poly A

1951 GAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG

2026 GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGTGGC

2101 GGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG  
 2176 GAACCGTAAAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACG

2251 CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG

2326 CTCTCTGTTCGACCCCTGCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA

2401 TAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT  
 ApaLI

2476 TCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT  
 Col E1

2551 GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC  
 AlwNI

2626 TAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT

2701 TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGGC

2776 CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCAGC

2851 TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA  
 BspHI

2926 ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGG  
 Bsu36I AlwNI

3001 GCCTTCACCCGAACCTTGGGGGGTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGG

3076 TGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAACAAACGACCCAACACCGTGCGTTTTT  
 TK poly A

3151 ATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGTTCTTCCGGTATTGTCTCTCTCCGTGTTTTCAGTTAGCCTCCC

3226 CCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAAACGAT  
 AvrII

3301 TCCGAAGCCCAACCTTTTCATAGAAGGCGGCGTGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTC  
 BstBI

3376 GGTCAATTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCG  
 263 PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIleArgGlnSerAspP  
 SapI

3451 GGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCATTCCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTA  
 246 roAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyLeuGluAlaIleAspArgThrA

3526 GCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTT  
 RsrII

221 laLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsnG

Fig. 1 (B) Fortsetzung I

3601 TCCACCATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACACGACGATCCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTG  
196 I uValMet I l eAsnProLeuCysAl aAspGlyHi sThr Val l eVal LeuAspGluGlyAspProMet Ser Al aLysL  
BclI

3676 AGCCTGGCGAACACCGGCTGGCGGAGCCCCCTGATGCTCTTGATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATC  
171 euArgAl aPheLeuGluAl aProAl aLeuGlyGlnHisGluGlnAspAspGlnAspVal LeuGlyAl aGluMetA  
3751 CGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCCGATCAAGCGTATGCAGC  
146 r gThrArgAl aArgGlu l eArgHisLysAl aGlnHisAspPheProCysThr Al aProAspLeuThr HisLeuA  
3826 CGCCGCATTCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGC  
121 r gArgMetAl aAspAl aMet l l eSer Val l eLysGluAl aProAl aLeuHisSer Ser LeuLeuAspGlnGlyProV  
Tth111I PvuII FspI

3901 ACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTC  
96 a l Gl uGlyLeuLeuLeuT rpAspArgGlyAl aGluThr Val l eVal AspLeuValAl aAl aCysProVal GlyThr T  
Neo-R.

MscI

3976 GTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGACAGTTTCATTTCAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAA  
71 hr Al aLeuT rpSer LeuArgAl aAl aGluAspGlnLeuGluAsnLeuAl aGlySer LeuAspThr LysVal l ePheL  
NarI

4051 AGAACC GGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACCGCGGCATCAGAGCAGCCGATGTGTGTGTGCCAGTCA  
46 euVal l eProArgGlyGlnAl aSer LeuArgPheValAl aAl aAspSer CysGly l l eThr GlnGlnAl aT rpAspT  
BsaBI

4126 TAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGAT  
21 y rGlyPheLeuArgGluVal l eT rpAl aAl aProSer GlyAl aHisLeuGlyAspGlnGlu l l eMet  
ClaI AvrII

4276 CCTCATCTGTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAG  
CTCAGAGGCCGAGGAGGCGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGC

---

SV40 ori & Promotor NsiI

4351 GGAAC TGGGCGGAGTTAGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT

---

SexAI NsiI

4426 GCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCT

---

PvuII

4501 TTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCACAGCTGGTTCTTT

---

Bsu36I

4576 TCCGCTCAGGACTCTTCCTTTTTCATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCA  
287 T rp  
Eam1105I

4581 ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT  
4585 Hi sLys l l eLeuSer Al aGly l l eGluAl a l l eGlnArgAsnArgGluAspMet Thr Al aGlnSer GlyThr Thr  
4586 GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACC  
4586 Tyr l l eValVal l l eArgSer ProLysGlyAspProGlyLeuAl aAl a l l e l l eGlyA rgSer GlyA rgGluGly  
4801 GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGC  
235 Al aGlySer LysAspAl a l l ePheT rpGlyAl aProLeuAl aSer ArgLeuLeuProGlyAl aVal l eLysAspAl a  
FspI Psp1406I

4876 CTCCATCCAGTCTATTAAATGTTGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGT  
210 Gl uMet T rpAsp l l eLeuGlnGlnArgSer Al aLeuThr LeuLeuGluGlyThr LeuLeuLysArgLeuThr Thr  
4951 TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC  
185 Al aMet Al aVal l eProMet Thr ThrAspArgGluAspAsnPro l l eAl aGluAsnLeuGluProGluT rpArgAsp  
PvuI

5026 AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAG  
160 LeuArgThr Val l eHisAspGlyMetAsnHisLeuPheAl aThr LeuGluLysProGlyGly l l eThr Thr LeuLeu  
5101 TAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAG  
135 LeuAsnAl aAl aThrAsnAspSerMet Thr l l eAl aAl aSer CysLeuGluArgVal l eThrMet GlyAspThr Leu  
bla Scal

5176 ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG  
110 Hi sLysGluThr Val l eProSer TyrGluVal l eLeuAspAsnGlnSer TyrHis l l eArgArgGlyLeuGlnGluGln  
Psp1406I

XmnI

5251 CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGGAACCGTTCTTC  
85 Gl yAl aAsp l l eArgSer LeuValAl aGlyCysLeuLeuVal l eLysPheThr SerMetMetProPheArgGluGlu

Fig. 1 (B) Fortsetzung II

5326 GGGGCGAAAACCTCTCAAGG TACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAC ACTCGTGACCCCAACTGATC  
 60 ProArgPheSer GluLeu IleLysGlySerAsnLeuAspLeuGlu IleTyrGlyVal ArgAlaGlyLeuGlnAsp  
 5401 TTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAT  
 35 GluAlaAspLysValLysValLeuThr GluProHisAlaPheValProLeuCysPheAlaAlaPhePheProIle  
 SspI  
 5476 AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG  
 10 LeuAlaValArgPheHisGlnIleSerMet  
 BspHI  
 5551 TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA  
 Stem loop A  
 5626 AGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC  
 5701 ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGGCTTTCCCGG  
 f1 IR Stem loop B  
 5776 TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGA  
 DralII Stem loop C Primer-RNA Start Tran:  
 5851 TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGCTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT  
 VS-Synthese  
 Nicking site Stem loop D Stem loop E  
 5926 CTTTAATAGTGGAAGTCTTGTTCCTAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGG  
 Apol Apol SspI  
 6001 GATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAT  
 6076 ATTAACGCTTACAATTTAC

Fig. 1 (B) Fortsetzung III

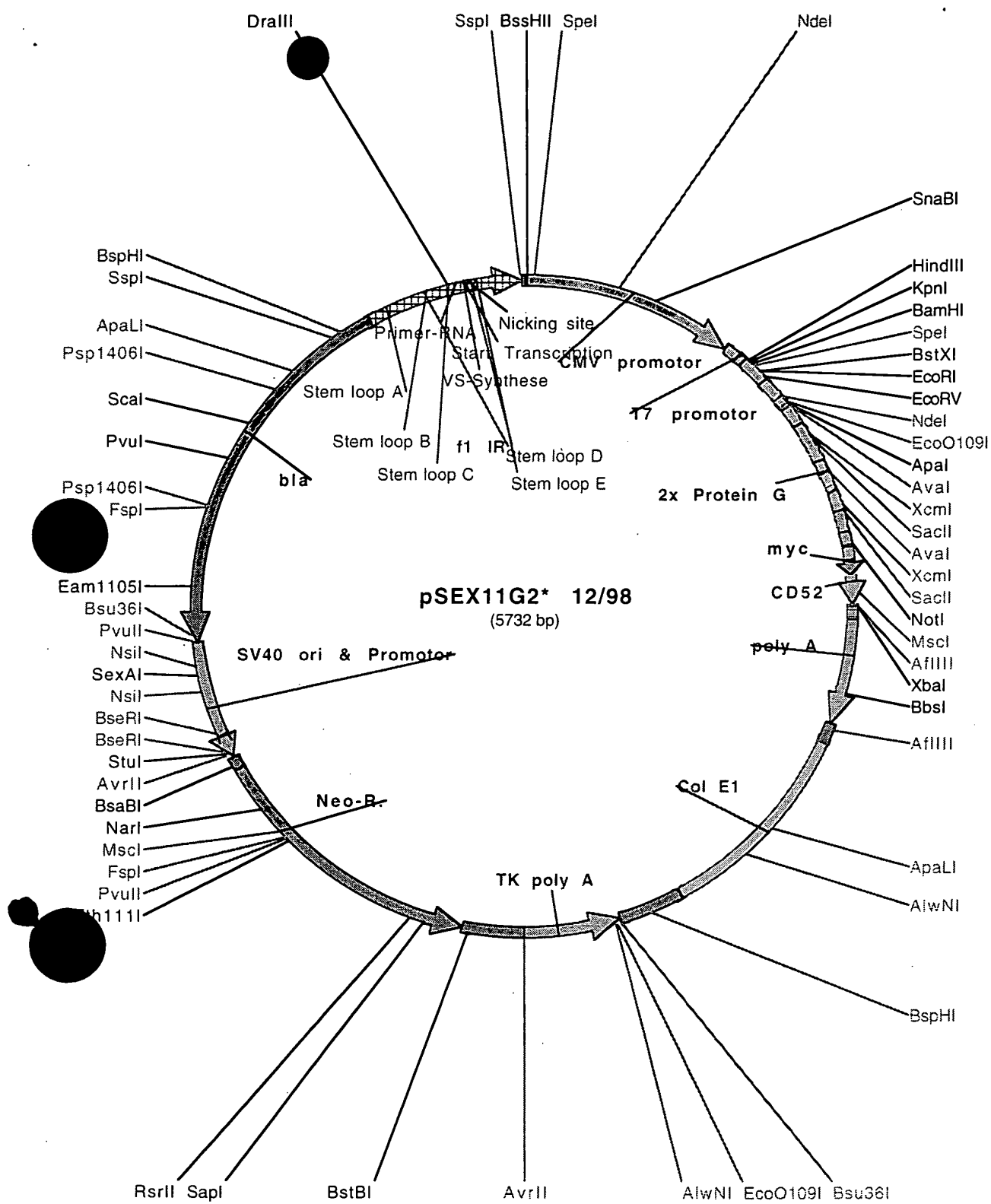


Fig. 2 (A)

**BssHII** **SpeI**  
1 GCGCGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATA  
76 TGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT  
151 CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGT  
**NdeI** **CMV**  
226 AAAGTGGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT  
**SnaBI**  
301 GGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA  
376 TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC  
451 CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA  
526 ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGC  
**T7 promotor** **HindIII** **KpnI**  
601 TAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACC  
**BamHI** **SpeI** **BstXI** **EcoRI** **EcoRV**  
76 GAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGGGATATCCACCATGGAGACAGACAC  
1 Met Gl u Thr Asp Th  
**NdeI**  
751 ACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGACTATCCATATGATGTTCCAGATTATGC  
5 r LeuLeuLeuT rpVal LeuLeuLeuT rpVal ProGlySer Thr GlyAspTyrProTyrAspVal ProAspTyrAl  
**Apal** **EcoO109I** **Aval**  
826 TGGGGCCCCAAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCCGCCGTGACCACCTACAAGCTAGTGATCAA  
30 aGlyAlaGlnLysProGluValIleAspAlaSerGluLeuThrProAlaValThrThrTyrLysLeuValIleAs  
**XcmI** **SacII**  
901 CGGCAAGACCCCTGAAGGGCGAGACCACCGAGGCCGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAAACAATA  
55 nGlyLysThrLeuLysGlyGluThrThrThrGluAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysValPheLysGlnTy  
**Aval**  
76 CGCTAATGACAACGGGGTCGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTTCACCGTGACCGAGAAGCC  
30 rAlaAsnAspAsnGlyValAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThrValThrGluLysPr  
51 CGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCCGCCGTGACCACCTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCCCTGAA  
105 oGluValIleAspAlaSerGluLeuThrProAlaValThrThrTyrLysLeuValIleAsnGlyLysThrLeuLy  
**XcmI** **SacII**  
1126 GGGCGAGACCACCGAGGCCGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAAACAATACGCTAATGACAACGG  
130 sGlyGluThrThrThrGluAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysValPheLysGlnTyrAlaAsnAspAsnGly  
**NotI**  
1201 GGTGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTTCACCGTGACCGAGGCCGCCGAGAACAAAACT  
155 yValAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThrValThrGluAlaAlaAlaGluGlnLysLe  
**myc**  
1276 CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGTGACGGACAAAACGACACCAGCCAAACCAGCCCCCTCAGCATC  
180 uIleSerGluGluAspLeuAsnGlyAlaValAspGlyGlnAsnAspThrSerGlnThrSerSerProSerAlaSe  
**CD52** **MscI**  
1351 CAGCAACATAAGCGGAGGCATTTTCCTTTTCTTCGTGGCCAAATGCCATAATCCACCTCTTCTGCTTCAGTTGAGG  
205 rSerAsnIleSerGlyGlyIlePheLeuPhePheValAlaAsnAlaIleIleHisLeuPheCysPheSer...

Fig. 2 (B)

**AflIII**XbaI  
1426 TGACACGTCTAGACCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG  
poly A  
1501 TTGCCAGCCATCTGTGTGTTGCCCCCTCCCCGTCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTCT  
1576 CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA  
**BbsI**  
1651 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA  
**AflIII**  
1726 AAGAACCAGTGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC  
1801 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGCTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC  
1876 ACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA  
1951 GCTCCCTCGTGCCTCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG  
**ApaLI**  
2026 TGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC  
**Col E1**  
2101 ACGAACCCCCCGTTGAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG  
**AlwNI**  
2176 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT  
2251 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT  
2326 TCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGC  
2401 AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA  
**BspHI**  
2476 ACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAA  
**EcoO109I**  
2551 AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTGG  
**Bsu36I** **AlwNI**  
26 CTGCGAGCCCTGGGCCTTACCCGAACTTGGGGGTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCC  
**TK poly A**  
2701 AATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAACAAACGACCCAA  
2776 CACCGTGCCTTTTATTCTGTCTTTTATTGCCGTCATAGCGGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTT  
**AvrII**  
2851 CAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGT  
2926 CCCGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTTCATAGAAGCGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTGCG  
**BstBI**  
3001 GCGTCGCTTGGTCGGTCATTTTCAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGCGCAT  
263 PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIle  
**SapI**  
3076 GCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTACAGCCATTGCGCGCAAGCTCTTCAGC  
251 ArgGlnSerAspProAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyGlyLeuGluGlyAla  
**RsrII**  
3151 AATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGTATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA  
226 IleAspArgThrAlaLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySer  
3226 AAAGCGGCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCCGG  
201 PheArgGlyAsnGluValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGlyHisThrValValLeuAspGluGlyAspPro

3301 CATGCTCGCCTTGAGCCTGACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCCCTGATGCTGATCATCCTGATCGACAAG  
 176 Met Ser Ala Lys Leu Arg Ala Leu Glu Ala Pro Ala Leu Glu Gly His Ser Asp Asp Glu Asp Val Leu  
 3376 ACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATC  
 151 Glu Ala Glu Met Arg Thr Arg Ala Arg Glu Ile Arg His Lys Ala Glu His Asp Phe Pro Cys Thr Ala Pro Asp  
 3451 AAGCGTATGCAGCCGCCGATTGTCATCAGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAG  
 126 Leu Thr His Leu Arg Arg Met Ala Asp Ala Met Ile Ser Val Lys Glu Ala Pro Ala Leu His Ser Ser Leu Leu  
 FspI  
 Tth111I PvuII  
 3526 ATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCA  
 101 Asp Glu N-Gly Pro Val Glu Glu Leu Leu Thr Asp Arg Glu Ala Glu Thr Val Val Asp Leu Val Ala Ala Cys  
 Neo-R.  
 MscI  
 3601 AGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCAGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGCAGTTCATTACAGGGCACCAGGACAGGTC  
 76 Pro Val Glu Thr Thr Ala Leu Thr Ser Leu Arg Ala Ala Glu Asp Glu N-Leu Glu Asn Leu Ala Glu Ser Leu Asp  
 NarI  
 3676 GGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG  
 51 Thr Lys Val Phe Leu Val Pro Arg Glu Gly N-Ala Ser Leu Arg Phe Val Ala Ala Asp Ser Cys Gly Ile Thr Glu  
 3751 TTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTC AAT  
 26 Glu N-Ala Thr Asp Tyr Glu Phe Leu Arg Glu Val Thr Ala Ala Pro Ser Glu Ala His Leu Glu Asp Glu N-Gly Ile  
 StuI  
 BsaBI AvrII BseRI  
 3826 CATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCTCACT  
 1 Met  
 BseRI  
 3976 ACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGAGGCGGCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGG  
 SV40 ori & Promotor  
 3976 GCGGAGAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACT  
 NsiI SexAI  
 4051 AATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAAT  
 NsiI  
 4126 TGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCC  
 PvuII Bsu36I  
 4201 ACAGCTGGTTCTTTCCGCTCAGGACTCTTCCTTTTCAATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGT  
 4276 CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCATCCATAGTTGCCT  
 287 Trp His Lys Ile Leu Ser Ala Glu Ile Glu Ala Ile Glu N-Arg Asn Arg Glu Asp Met Thr Ala Glu  
 Eam1105I  
 4426 GACTCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAG  
 164 nSer Gly Thr Thr Tyr Ile Val Val Ile Arg Ser Pro Lys Glu Asp Pro Gly Leu Ala Ala Ile Ile Glu Arg Ser  
 4426 ACCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTCTG  
 239 r Glu Arg Glu Glu Ala Glu Ser Lys Asp Ala Ile Phe Thr Glu Ala Pro Leu Ala Ser Arg Leu Leu Pro Glu Ala  
 4501 CAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTT  
 214 a Val Lys Asp Ala Glu Met Thr Asp Ile Leu Glu N-Glu N-Arg Ser Ala Leu Thr Leu Leu Glu Glu Thr Leu Leu Lys  
 FspI Psp1406I  
 4576 TGC GCAACGTGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCG  
 189 s Arg Leu Thr Thr Ala Met Ala Val Pro Met Thr Thr Asp Arg Glu Asp Asn Pro Ile Ala Glu Asn Leu Glu Pro  
 PvuII  
 4651 GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCTCCGA  
 164 o Glu Thr Arg Asp Leu Thr Val His Asp Glu Met Asn His Leu Phe Ala Thr Leu Glu Lys Pro Glu Gly Ile  
 4726 TCGTTGTGCAAGTAAGTTGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTCA  
 139 e Thr Thr Leu Leu Asn Ala Ala Thr Asn Asp Ser Met Thr Ile Ala Ala Ser Cys Leu Glu Arg Val Thr Me  
 bla Scal  
 4801 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC  
 114 t Glu Asp Thr Leu His Lys Glu Thr Val Pro Ser Tyr Glu Val Leu Asp Asn Glu N-Ser Tyr His Ile Arg Arg Glu  
 4876 CGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAAGCTTTAAAAGTGTCTCATCATTTG  
 89 y Leu Glu N-Glu N-Glu Ala Asp Ile Arg Ser Leu Val Ala Glu Cys Leu Leu Val Lys Phe Thr Ser Met Met Pro  
 Psp1406I ApaLI  
 4951 GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTG  
 64 o Phe Arg Glu Glu Pro Arg Phe Ser Glu Leu Ile Lys Glu Ser Asn Leu Asp Leu Glu Ile Tyr Glu Val Arg Ala

Fig. 2 (B) Fortsetzung II

5026 CACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCG  
 394 aGlyLeuGlnAspGluAlaAspLysValLysValLeuThrGluProHisAlaPheValProLeuCysPheAlaAla  
 SspI  
 5101 CAAAAAAGGGAATAGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTT  
 144 aPhePheProIleLeuAlaValArgPheHisGlnIleSerMet  
 BspHI  
 5176 ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCA  
 5251 CATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA  
 Stem loop A  
 5326 GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCG  
 f1 IR Stem loop B  
 5401 CCGGCTTTCCCCGTCAGGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACC  
 DraIII Stem loop C Primer-RNA  
 5476 CCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGT  
 Start Transcription  
 VS-Synthese Nicking site Stem loop D Stem loop E  
 5551 TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT  
 5626 TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGA  
 SspI  
 5701 ATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAC

Fig. 2 (B) Fortsetzung III

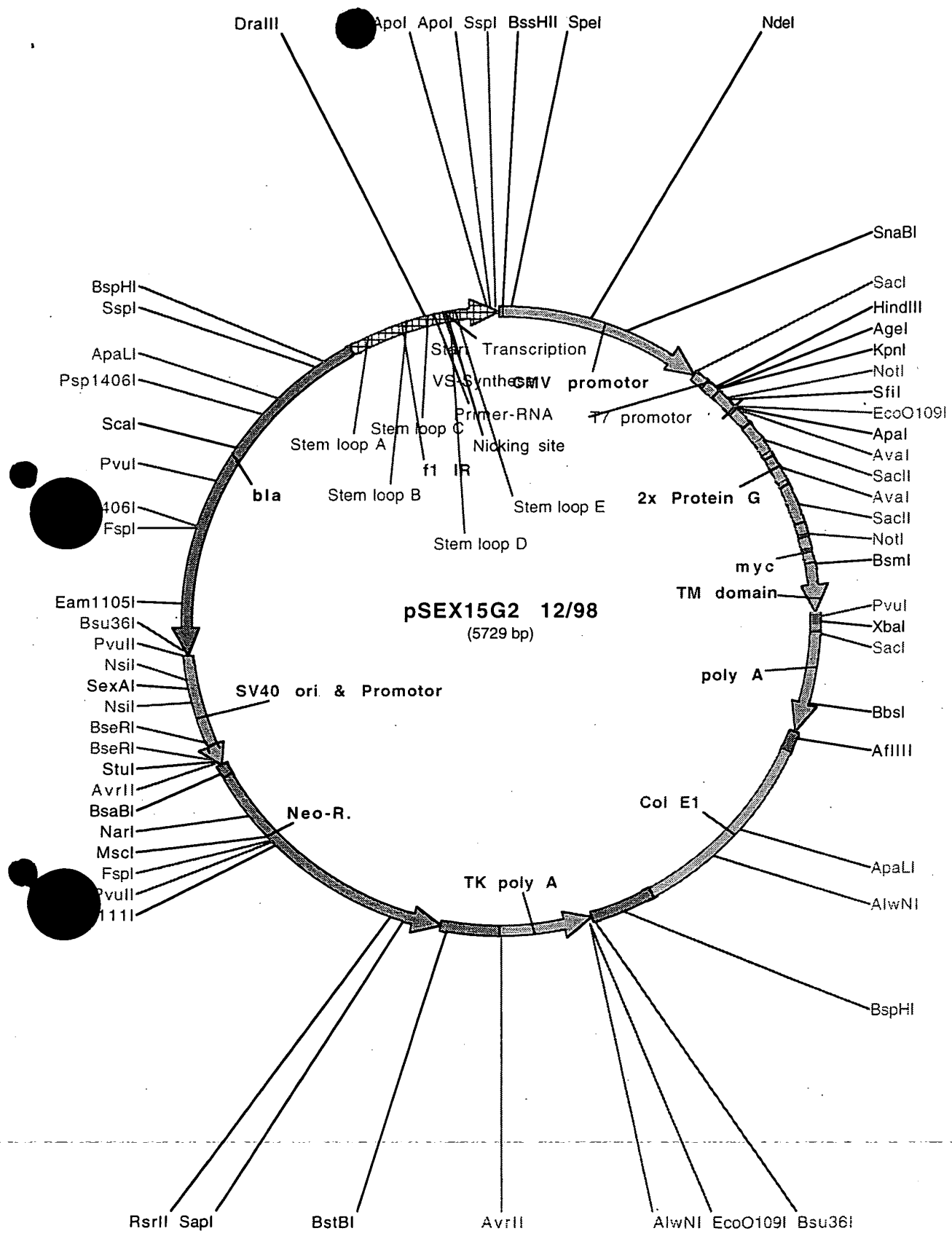


Fig. 3 (A)

BssHII SpeI  
 1 GCGCGCGTTGACATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA  
 76 TGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT  
 151 CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGT  
 NdeI CMV  
 226 AAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT  
 SnaBI  
 301 GGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA  
 376 TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC  
 451 CAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA  
 SacI  
 526 ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGC  
 Agel  
 601 TAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACC  
 T7 promoter HindIII KpnI  
 SfiI NotI Apal EcoO109I  
 676 GGTGCGATGGCACCCTGCATGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCCCTGGCCCCGACTCAGACCCGCGCGGGGGCC  
 1 MetAl aProCysMetLeuLeuLeuLeuAl aAl aAl aLeuAl aProThr Gl nThr ArgAl aGl yAl a  
 Aval  
 751 CAAAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCCGCGGTGACCACCTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAG  
 24 Gl nLysProGl uVal l l eAspAl aSer Gl uLeuThr ProAl aVal Thr Thr TyrLysLeuVal l l eAsnGl yLys  
 SacII  
 826 ACCCTGAAGGGCGAGACCACCACCGAGGCCGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAAACAATACGCTAAT  
 49 Thr LeuLysGl yGl uThr Thr Thr Gl uAl aVal AspAl aAl aThr Al aGl uLysVal PheLysGl nTyrAl aAsn  
 Aval  
 2x Protein G  
 901 GACAACGGGGTCGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTTCACCGTGACCGAGAAGCCCCGAGGTG  
 74 AspAsnGl yVal AspGl yGl uT rpThr TyrAspAspAl aThr LysThr PheThr Val Thr Gl uLysProGl uVal  
 976 ATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCCGCGGTGACCACCTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCCCTGAAGGGCGAG  
 99 l l eAspAl aSer Gl uLeuThr ProAl aVal Thr Thr TyrLysLeuVal l l eAsnGl yLysThr LeuLysGl yGl u  
 SacII  
 1051 ACCACCACCGAGGCCGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAAACAATACGCTAATGACAACGGGGTCGAC  
 124 Thr Thr Thr Gl uAl aVal AspAl aAl aThr Al aGl uLysVal PheLysGl nTyrAl aAsnAspAsnGl yVal Asp  
 NotI  
 1126 GGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTTCACCGTGACCGAGGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCA  
 149 Gl yGl uT rpThr TyrAspAspAl aThr LysThr PheThr Val Thr Gl uAl aAl aAl aGl uGl nLysLeu l l eSer  
 myc BsmI  
 1201 GAAGAGGATCTGAATGGGGCCGTCGACGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGCTGTGGGCCAGGAC  
 174 Gl uGl uAspLeuAsnGl yAl aVal AspGl uGl nLysLeu l l eSer Gl uGl uAspLeuAsnAl aVal Gl yGl nAsp  
 1276 ACGCAGGAGGTATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTG  
 199 Thr Gl nGl uVal l l eVal Val ProHi sSer LeuProPheLysVal Val Val l l eSer Al a l l eLeuAl aLeuVal  
 TM domain PvuI  
 1351 GTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCTCATCATGCTTTGGCAGAAAGGCCACGTTCTCGGCCGATCGAGAA  
 224 Val LeuThr l l e l l eSer Leu l l e l l eLeu l l eMetLeuTrpGl nLysLysProArgSer Ser Al aAspArgGl u

Fig. 3 (B)

XbaI  
 1426 TCCATCTAGAGCTATTCTA...GTGTCACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCA...TCGACTGTGCCTTCTAGTTG  
 249 Ser Ile... ←

SacI  
 1501 CCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTA  
 poly A

1576 ATAAATGAGGAAATGTCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG

BbsI  
 1651 CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAG

AflIII  
 1726 AACCAGTGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGC  
 1801 AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA

1876 AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAGATACCAGCGCTTTCCCCCTGGAAGCT  
 1951 CCCTCGTGCCTCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAACCGTGG

ApaLI  
 2026 CGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG

Col E1  
 2101 AACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGCTAAGACACGACT

AlwNI  
 2176 TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA  
 2251 AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG  
 2326 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC  
 2401 AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACG

BspHI  
 2476 AAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAAT

EcoO109I  
 2551 GAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTG  
 Bsu36I AlwNI  
 2551 CGAGCCCTGGGCCTTCACCCGAACCTTGGGGGTGGGGTGGGGAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCAAT

TK poly A  
 2701 GGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTTATGAACAAACGACCCAACAC  
 2776 CGTGCCTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAG

AvrII  
 2851 TTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCC  
 2926 GGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTTCATAGAAGGCGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTGGGGC

BstBI  
 3001 TCGCTTGGTCGGTCATTTTCAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG  
 263 PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIleArg

SspI  
 3076 CTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCAGGAGGAAAGCGGTACGCCATTGCGCCCAAGCTCTTCAGCAAT  
 250 GlnSerAspProAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyLeuGluAlaIle

RsrII  
 3151 ATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAA  
 225 AspArgThrAlaLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPhe  
 3226 GCGGCCATTTTCCACCATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACACGAGATCCTCGCCGTCGGGCAT  
 200 ArgGlyAsnGluValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGlyHisThrValValLeuAspGluGlyAspProMet

Fig. 3 (B) Fortsetzung I

3301 GCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCCCTGATGCTCTTGATCATCCTGATCGACAAGACC  
 175 Ser AlaLysLeuArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyGlnHisGlnAspAspGlnAspValLeuGly  
 3376 GGCTTCCATCCGAGTGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGCATCGAATGGGCGAGTAGCCGGATCAAG  
 150 AlaGluMetArgThrArgAlaArgGluLeuArgHisLysAlaGlnHisAspPheProCysThrAlaProAspLeu  
 3451 CGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATC  
 125 ThrHisLeuArgArgMetAlaAspAlaMetIleSerValLysGluAlaProAlaLeuHisSerSerLeuLeuAsp  
 Tth111I PvullFspI  
 3526 CTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG  
 100 GlnGlyProValGluGlyLeuLeuLeuTrpAspArgGlyAlaGluThrValValAspLeuValAlaAlaCysPro  
 Neo-R.  
 MscI  
 3601 AACGCCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGACAGTTTCATTTCAGGGCACCGGACAGGTTCGGT  
 75 ValGlyThrThrAlaLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGluAspGlnLeuGluAsnLeuAlaGlySerLeuAspThr  
 NarI  
 3676 CTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTG  
 50 LysValPheLeuValProArgGlyGlnAlaSerLeuArgPheValAlaAlaAspSerCysGlyIleThrGlnGln  
 3751 TGCCCACTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCAT  
 25 AlaTrpAspTyrGlyPheLeuArgGluValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHisLeuGlyAspGlnGluIleMet  
 StuI  
 BsaBI AvrII BseRI  
 3826 GCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACT  
 BseRI  
 401 TCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGAGGCGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCG  
 SV40 ori & Promotor  
 3976 GAGAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAAT  
 NsiI SexAI  
 4051 TGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGA  
 NsiI Pvull  
 4126 GATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACA  
 Bsu36I  
 4201 GCTGGTTCTTTCCGCCTCAGGACTCTTCCTTTTCAATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG  
 Eam11I  
 4276 ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGAC  
 287 TrpHisLysIleLeuSerAlaGlyIleGluAlaIleGlnArgAsnArgGluAspMetThrAlaGlnSe  
 4351 TCCCCGTCGTGTAGATACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC  
 163 rGlyThrThrTyrIleValValIleArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAlaIleIleGlyArgSerGly  
 4356 CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAA  
 168 yArgGluGlyAlaGlySerLysAspAlaIlePheTrpGlyAlaProLeuAlaSerArgLeuLeuProGlyAlaVa  
 FspI  
 4501 CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTCGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGC  
 213 LysAspAlaGluMetTrpAspIleLeuGlnGlnArgSerAlaLeuThrLeuLeuGluGlyThrLeuLeuLysAr  
 Psp1406I  
 4576 GCAACGTGTGTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTT  
 188 gLeuThrThrAlaMetAlaValProMetThrThrAspArgGluAspAsnProIleAlaGluAsnLeuGluProGly  
 Pvul  
 4651 CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCG  
 163 uTrpArgAspLeuArgThrValHisAspGlyMetAsnHisLeuPheAlaThrLeuGluLysProGlyGlyIleTh  
 4726 TTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGC  
 138 rThrLeuLeuLeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerMetThrIleAlaAlaSerCysLeuGluArgValThrMetGly  
 bla Scal  
 4801 CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGA  
 113 yAspThrLeuHisLysGluThrValProSerTyrGluValLeuAspAsnGlnSerTyrHisIleArgArgGlyLe  
 4876 GTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAA  
 88 uGlnGluGlnGlyAlaAspIleArgSerLeuValAlaGlyCysLeuLeuValLysPheThrSerMetMetProPh  
 Psp1406I ApaLI  
 4951 AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC  
 63 eArgGluGluProArgPheSerGluLeuIleLysGlySerAsnLeuAspLeuGluIleTyrGlyValArgAlaGly

Fig. 3 (B) Fortsetzung II

5026 CCAACTGATCTTCAGCATCTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAGGAAGGCAAAATGCCGCAA  
 38 yLeuGl nAspGl uAl aAspLysVal LysVal LeuThr Gl uProHi sAl aPheProLeuCysPheAl aAl aPh

Sspl

5101 AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCATATTATTGAAGCATTATC  
 13 ePheProIleLeuAl aValA rgPheHi sGl nIleSerMet

BspHI

5176 AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT  
 5251 TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCG

Stem loop A

5326 TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCG

f1 IR

Stem loop B

5401 GCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCA

DrallI

Stem loop C

Primer-RNA

5476 AAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGG

Start Transcription

VS-Synthese Nicking site

Stem loop D

Stem loop E

551 AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTG

Apol

Apol

5626 ATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATT

Sspl

5701 TTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAC

Fig. 3 (B) Fortsetzung III

THIS PAGE BLANK (USPTO)